

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890200

研究課題名(和文)人工心肺手術における血栓形成メカニズムの解明と、新規モニタリング装置への応用

研究課題名(英文)The Elucidation of Thrombus Formation and the Application to Novel Monitoring in Cardiopulmonary Bypass Surgery

研究代表者

小川 覚 (OGAWA, SATORU)

京都府立医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50636131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：人工心肺後には、濃厚血小板液輸注による血小板の量的・質的補充が治療の中心となっているが、投与基準となるデータやそのモニタリング法は未だ確立していない。本研究では、人工心肺手術予定患者からの採取する検体を使用し、血流環境下で形成された血小板血栓形成を多面的に観察することで、臨床的な血小板数と機能の低下の相互関係を調査した。結果、人工心肺は、血液希釈による血小板数の低下と血小板機能低下の両者により、血小板形成能を低下させた。また、抗凝固薬は、局所でのトロンビン濃度低下により血小板形成にも影響を及ぼした。周術期の止血モニタリングには、血流を反映できるあたらしい装置の開発が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：After cardiopulmonary bypass (CPB) surgery, platelet concentration is the mainstay approach for hemostasis. The cut-off value and its monitoring, however, are not established in clinical practice. This study is conducted to investigate the interaction between platelet number and platelet function in the blood flow. In result, CPB caused the depletion in platelet count after hemodilution and inhibition of platelet function. We also observed the anticonagulants affect platelet thrombus formation by low thrombin generation on thrombus surface in flow condition. In conclusion, blood flow should be included on the development of novel monitoring apparatus for the perioperative bleeding.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：血栓 止血 人工心肺 フローチャンバー 血流 血小板

1. 研究開始当初の背景

人工心肺を使用した開心手術、および周術期の大量出血時などにおける高度の血液希釈は、血小板数を低下させ、一時止血を困難とする。加えて、術前の抗血栓薬による残存効果や、人工心肺使用に伴う低体温環境は血小板の機能低下は周術期の出血リスクを助長することが知られている。これら人工心肺後の血小板が原因と考えられる止血異常に対しては、濃厚血小板液輸注による血小板の量的・質的補充が、現在、治療の中心となっている(田中、小川、他. 臨床麻酔 2011; 35: 9-18.)。しかしながら、その投与判断は通常、測定された血小板数単独により評価され、また、その基準値は施設や担当医によっても大きく異なっている。近年、輸血製剤の適正使用が注目される一方で、投与基準となる検査値と、その最適なモニタリング法については、未だ確立していないのが現状である。

研究代表者は、これまで血流環境下における血栓形成に与える因子、つまり、ズリ応力低下や血小板数低下が、全血凝固反応を包括した血栓強度にも影響を及ぼすことを報告してきた(Ogawa S, et al. Thromb Haemost 2011;106:1215-23.)。このような背景から、より生理的な血栓(止血)過程を反映すると考えられるフローチャンバーシステムを、人工心肺後の包括的な血小板止血障害の診断に応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は、全血検体を用いた予備実験より、血液希釈と血小板機能低下の2因子が血小板血栓の形成過程に相互に影響していると仮説を立てた。そこで、今回、血液検体を用いて人工心肺手術後モデルを作製し、血流環境下で形成された血小板血栓形成を多面的に観察した。血小板数低下と機能低下の相互関係を、静的、および動的環境下において、包

括的に解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

人工心肺による血液希釈と血小板機能低下の出血モデルを作製するために、成人健常者(n=6)から採取したクエン酸加全血検体を用いて、in vitro 血液希釈操作(45%希釈、生理食塩水)と P2Y₁₂ 受容体遮断薬の添加(Prasugrel, 終濃度 10 μM)を行なった。この検体を、血小板凝集能検査、またはフローチャンバー実験を行い、全血血栓形成能を評価した。また、抗凝固薬が血栓形成能に与える影響を評価するために、ダビガトラン(活性代謝物, 終濃度 500nM)を使用し、抗凝固薬と抗血小板薬の併用が血栓形成に与える影響についても、あわせて検討した。

(1) 血小板凝集能

静的血小板血栓形成を評価するために、全血血小板凝集測定器(Multiplate; Dynabyte, Munich, Germany)を使用した。検体はHirudin加全血検体とし、活性試薬にはADP (10 μM)を用いた。

(2) フローチャンバー装置

流体下における血小板血栓形成能を、フローチャンバー装置(Total Thrombus-formation Analyzing System, T-TAS; Fujimori Kogyo, Tokyo, JAPAN)を用いて行なった。Hirudin処理(15 μl/ml)にて抗凝固処理を行なった全血検体を、任意の動脈ズリ速度下(1500s⁻¹)でマイクロチップ内(キャピラリーを型コラーゲンでコーティング)を灌流させた。測定項目は、血小板血栓形成に伴うキャピラリー内部の圧力変化を計測することで、その血栓強度の指標とした。また、形成される血栓を video-microscope (×10)にて経時的に観察することにより、血小板血栓の凝集や飛散を視覚的に評価した。

抗凝固薬の効果判定には、コラーゲンと tissue factor でコーティングしたマイクロチップを使用し、還流実験を行なった。検体には、3.2%クエン酸加全血を還流直前に Ca 溶液でクエン酸活性を拮抗したものをを用いた。

4. 研究成果

(1) 静的血栓形成

抗血小板薬に添加により、ADP 血小板凝集検査は有意に抑制された。また、これに血液希釈操作を加えると、相加的な凝集抑制が確認できた。しかしながら、両インターベンションによっても、検体容器内での血小板凝集（透過光）は完全には抑制されなかった。

(2) 動的血栓形成

フローチャンバー装置を用いた血流下の血栓観察では、Prasugrel の添加をおこなっても、血小板形成開始時間はほとんど変化がなかった。その一方で、圧変化曲線からなる血栓強度 (Area under curve) は、Prasugrel 添加により、有意に低下した ($p < 0.05$)。これに、40%血液希釈操作を加えると、流体下に血栓形成は完全に消失するのが確認できた (観察時間: 10 分間)。検鏡下における連続観察でも、キャピラリー圧変化による血栓形成評価と同様の結果であった。また、von Willebrand factor (終濃度 1.5 U/mL) は、血小板の粘着の改善を認めたが、最終的な血栓強度の改善は認めなかった。ダビガトラン添加実験では、血流下における Prasugrel の血栓形成抑制を、相加的に増強させた。これには、局所でのトロンビン濃度が、活性化血小板を核とする血小板血栓の産生にも影響していると考えられた。

(3) 結果のまとめ

静的環境と動的環境での血栓形成能に相違がみられた事は、生体内で血小板形成が形成される過程で、血球成分により壁面で発生するずり応力の影響が考えられる。周術期の大量出血や人工心肺といった生体での血液希釈時には、静的検査よりも、フローチャンバー装置といった流体の影響を反映可能な新しいモニタリング装置の開発が望ましいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

(1) Satoru Ogawa, Tomoko Ohnishi, Kazuya Hosokawa, Fania Szlam, Edward P. Chen, Kenichi A. Tanaka. Haemodilution-induced Changes in Coagulation and Effects of Haemostatic Components under Flow Conditions. *British Journal of Anaesthesia*. 2013;111:1013-23. doi:10.1093/bja/aet229. (査読有)

(2) Satoru Ogawa, Michael A. Mazzeffi, Fania Szlam, Jerrold H. Levy, Kazuya Hosokawa, Kenichi A. Tanaka. Influences of hemodilution and anticoagulation on anti-platelet P₂Y₁₂ therapy - *In vitro* whole blood perfusion model. *JCTVA*. 2013;27: e69-7. doi: 10.1053/j.jvca.2013.06.010. (査読有)

(3) Kenichi A Tanaka, Katherine Egan, Fania Szlam, Satoru Ogawa, John D Roback, Gautam Sreeram, Robert A Guyton, Edward P Chen. Transfusion and hematologic variables after fibrinogen or platelet transfusion in valve replacement surgery: preliminary data of purified lyophilized

human fibrinogen concentrate versus conventional transfusion. Transfusion. 2014; 54:109-18. doi: 10.1111/trf.12248. (査読有)

(4) Kenichi A. Tanaka, Michael A. Mazzeffi, Matthias Grube, Satoru Ogawa, Edward P. Chen. 3-factor Prothrombin Complex Concentrate and Hemostasis after High-risk Cardiovascular Surgery. Transfusion. 2013;53, 920-1. doi: 10.1111/trf.12110. (査読有)

(5) 小川覚、中嶋康文、平崎裕二、溝部俊樹. 人工心肺手術におけるヘパリン抗凝固と、そのモニタリング -ACTを活用する-. The Journal of the Japanese Society of Cardiovascular Anesthesiologists 2013; 17. 43-50.

(6) 小川覚、中嶋康文、溝部俊樹. <質疑応答> 洗浄赤血球-LR「日赤」について. 臨床麻酔 2013; 37: 1792-4.

(7) 中嶋康文、小川覚、溝部俊樹. 周術期における血栓塞栓症と抗血小板・抗凝固療法-新規抗血栓薬と今後のブリッジング療法-. LiSA 2013; 20: 240-6.

〔学会発表〕(計7件)

(1) 小川覚. 『危機的出血への対応シンポジウム: 抗血栓療法を受ける患者の緊急手術における止血管理-本邦での対応-』(シンポジウム). 第36回日本血栓止血学会総会、大阪、2014年5月29日.

(2) 小川覚. 『大量出血症例における急

性凝固障害に対する最適輸血量法を考える: 心臓血管外科領域での大量出血への対応』(シンポジウム) 第62回日本輸血細胞治療学会総会、奈良、2014年5月15日.

(3) 小川覚. 『周術期の出血と、フィブリノゲン-もう迷わない、止血へのアプローチ』(企業共催セミナー) 第61回日本麻酔科学会総会、横浜、2014年5月15日.

(4) 小川覚. 『手術室内での危機管理-突然の危機に際しても麻酔科医がコマンダーとなって冷静に対応する: 術中の突然の大量出血』(PBLD). 第61回日本麻酔科学会総会、横浜、2014年5月16日.

(5) 小川覚. 『広報委員会: 麻酔科に必要な技術、技能と臨床診療における諸問題: 最後の砦』(PBLD) 第61回日本麻酔科学会総会、横浜、2014年5月16日.

(6) Satoru Ogawa, K.A.Tanaka, Ysufumi Nakajima, Yoshinobu Nakayama, Jun Takeshita, Masatoshi Arai, Toshiki Mizobe. Evaluation of the Dry-Hematology System (DRHEMATO®) to Assess Whole Blood Fibrinogen Levels During Cardiopulmonary Bypass Surgery. Society of Cardiovascular Anesthesiologists. (口演)Annual Meeting, New Orleans, 2014年4月1日

(7) 小川覚. 「血液凝固異常と区域麻酔~新規抗血栓薬を考える~」(口演). 第3回術後疼痛懇話会、京都、2013

年7月19日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川覚 (OGAWA SATORU)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号： 50636131